

С.Е. Ткачев¹, Н.Н. Ливанова^{1, 2}**РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВИДОТИПИРОВАНИЯ КЛЕЩЕЙ
IXODES PERSULCATUS И *IXODES PAVLOVSKYI***¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск)² Институт систематики и экологии животных (Новосибирск)

Определение вида клещей является важным в эпидемиологических и экологических исследованиях, однако не всегда возможно морфологически. В данной работе на основе последовательностей фрагмента гена субъединицы 1 цитохром-оксидазы была сконструирована ПЦР-система для молекулярного видотипирования клещей *Ixodes persulcatus* и *Ixodes pavlovskyi*, позволяющая специфически разделять эти два вида.

Ключевые слова: *Ixodes persulcatus*, *Ixodes pavlovskyi*, видотипирование

**THE DEVELOPMENT OF MOLECULAR SPECIES TYPING SYSTEM
FOR *IXODES PERSULCATUS* AND *IXODES PAVLOVSKYI* TICKS**S.E. Tkachiov¹, N.N. Livanova^{1, 2}¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk² Institute of Systematic and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk

Determination of ticks species is very important for epidemiology and ecology investigations but in some cases the morphological study couldn't be carried out. In this work the PCR system based on species-specific primers to cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene sequence was developed for molecular species typing of *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pavlovskyi* ticks.

Key words: *Ixodes persulcatus*, *Ixodes pavlovskyi*, species-typing

Определение видов клещей — переносчиков разнообразных патогенов человека и животных, — имеет важное значение для эпидемиологических и экологических исследований в природных очагах. Однако в ряде случаев определение вида клеща морфологически является невозможным из-за отсутствия целого экземпляра с систематически значимыми признаками либо при проведении ретроспективного анализа образцов клещей, из которых с целью детекции патогенов молекулярно-генетическими методами были выделены нуклеиновые кислоты (генетический материал). Одним из подходов к решению этой проблемы может стать видотипирование клещей молекулярно-биологическими методами.

Ранее для клещей *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758), *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930), *Ixodes hexagonus* (Leach, 1815) и *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794), имеющих важное эпидемиологическое значение для территории Евразии, были предложены видоспецифичные системы ПЦР для типирования [3]. Для клещей *I. pavlovskyi* (Pomerantsev, 1946) в XX веке ареал на территории СССР был представлен двумя разобщенными частями, но исследования последних лет, проводимые в Западной Сибири, показали, что в начале XXI века в окрестностях г. Томска зарегистрирован устойчивый рост его обилия, а в окрестностях Новосибирского научно-го центра было показано устойчивое сообитание клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* при явной преобладании последнего [1, 2].

В настоящее время в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) для видов

клещей, найденных на территории Западной Сибири содержится ряд последовательностей, соответствующим различным локусам митохондриального и ядерного геномов. Одним из локусов, позволяющих проводить молекулярно-генетическое видотипирование, является ген цитохром с-оксидазы (цитохромоксидазы), кодирующий фермент класса оксидоредуктаз, который катализирует конечный этап переноса электронов на кислород в процессе окислительного фосфорилирования. Данный ген находится в геноме митохондрий клеток. Так как митохондриальная ДНК не является высококонсервативной и имеет высокую скорость мутирования, она является хорошим объектом для изучения филогении (эволюционного родства) живых организмов, а также видотипирования. В настоящее время в базе данных GenBank создан раздел GenBank: barcode (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/index.cgi?tool=barcode>), содержащий информацию о последовательностях субъединицы I гена цитохромоксидазы, которые были выбраны как генетический «штрих-код» (barcode) для различных видов организмов.

Целью данной работы являлось конструирование ПЦР-системы для видотипирования клещей видов *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* молекулярными методами.

МЕТОДИКА**Выделение ДНК из клещей**

Выделение ДНК проводили из каждого клеща индивидуально. Для этого клеща замораживали, измельчали, помещали в полипропиленовую про-

бирку объемом 1,5 мл типа Eppendorf и проводили выделение с использованием коммерческих наборов «Проба НК» (ДНК-технология, Москва) в соответствии с инструкцией производителя.

Постановка ПЦР

Реакцию амплификации проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1х буфер для ПЦР (5х буфер для ПЦР — 0,335 М Трис-НСl pH 8,9, 88 мМ (NH₄)₂SO₄, 10 мМ MgCl₂, 0,05 % Tween 20, 25 % глицерин, 0,1 % крезоловый красный), 200 мкМ дНТФ, 0,5 мкМ праймеров, 2 ед. акт. Taq-ДНК полимеразы и 1 мкл выделенной ДНК. На поверхность смеси наслаивали минеральное масло. В качестве отрицательного контроля использовали бидистиллированную воду. Амплификацию проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-Технология», Москва). Протокол проведения ПЦР состоял из 35 циклов амплификации, каждый из которых включал стадию денатурации (94 °С, 0,5 мин), стадию отжига (52 °С, 0,5 мин) и стадию элонгации (72 °С, 1 мин).

Электрофоретическая детекция продуктов ПЦР

Детекция продуктов ПЦР проводилась методом гель-электрофореза в 1,0%-ном горизонтальном агарозном геле, содержащем бромистый этидий в концентрации 2 мкг/мл, в 1хTBE буфере (20х буфер TBE — 1 М Трис, 1 М Н₃ВО₃, 40 мм ЭДТА, pH 8,0) при напряжении 5 В/см. Наличие полученных видоспецифичных ПЦР-фрагментов определялось визуально при УФ.

Определение нуклеотидных последовательностей и молекулярно-генетический анализ.

Определение нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР, соответствующих фрагментам генома ВКЭ, проводили с помощью наборов BigDye Terminators Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems, США) с применением автоматического анализатора ДНК модели ABI 310 (Applied Biosystems, США) в Центре секвенирования ДНК СО РАН. Поиск гомологии полученных нуклеотидных последовательностей с уже известными последовательностями фрагментов геномов клещей проводили с помощью программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В настоящее время (по состоянию на начало июля 2012 г.), в базе данных GenBank содержатся 10 и 2 последовательности фрагментов гена субъединицы 1 цитохром-оксидазы для клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*, соответственно, и только по одной полноразмерной последовательности гена для каждого из этих видов клещей. Анализ последовательностей показал, что несмотря на внутривидовую вариабельность, внутри каждого из видов наблюдается высокая консервативность последовательности гена субъединицы 1 цитохром-оксидазы (более 99 % гомологии), что позволило разработать видоспецифичные праймеры:

1) прямой родоспецифичный праймер:

Ixodes-F 5'- ACCTGATATAGCTTCCCTCG -3'

(соответствует позициям 1485 — 1505 н.о. в последовательности митохондриального генома *I. persulcatus* (Genbank AB073725);

2) обратные видоспецифичные праймеры:

для *I. persulcatus*:

Ipers-R 5'- TTgATTCCCTgTTggAACAgC -3' (соответствует позициям 2155-2174 н.о. митохондриального генома *I. persulcatus*)

для *I. pavlovskyi*:

Ipav-R 5'- TAATCCCCgTgggggACg -3' (соответствует позициям 2157-2173 н.о. митохондриального генома *I. persulcatus*)

С использованием сконструированных праймеров, методом ПЦР были исследовано 140 клещей видов *I. persulcatus* (91 экз.), *I. pavlovskyi* (41 экз.) и *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) (8 экз.), собранных на территории Новосибирской области (в районе Новосибирского научного центра и Тогучинском районе), определенных морфологически. Было показано, что клещи *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* выявляются соответствующими видоспецифичными праймерами, в то время как клещи *D. reticulatus* используемой системой праймеров не выявляются (рис. 1). С целью подтверждения специфичности выявления видов клещей для ряда случайно выбранных положительных в ПЦР образцов было проведено секвенирование полученных ПЦР-фрагментов. Было показано, что последовательности, соответствующие образцам *I. persulcatus*, обладают более 99 % гомологии с последовательностями гена субъединицы 1 цитохром-оксидазы клещей *I. persulcatus*, собранными на территории о. Хоккайдо, Япония [4], и Внутренней Монголии, Китай (GenBank AB073725 и JF758629). Для образцов *I. pavlovskyi*, была показано, что их последовательности также обладают более 99 % гомологии с последовательностью, определенной ранее для клещей *I. pavlovskyi*, выделенных на территории о. Хоккайдо, Япония (номер в GenBank AB231669) [5].

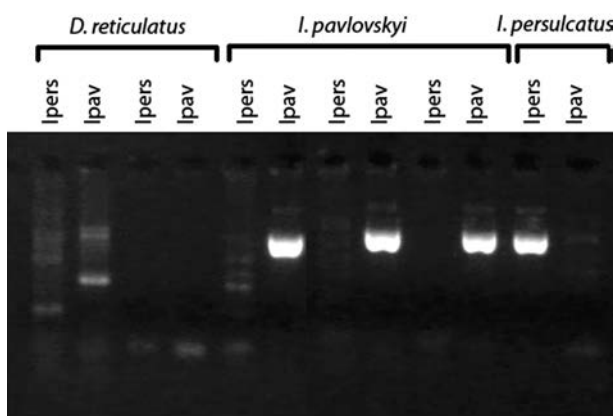


Рис. 1. Электрофоретическое выявление видоспецифичных продуктов ПЦР. *Ipers* и *Ipav* – дорожки со специфичными праймерами к видам *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*, соответственно. Дорожки 1–4 – образцы *D. reticulatus*; 5–10 – образцы *I. pavlovskyi*; 11–12 – образцы *I. persulcatus*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами была сконструирована ПЦР-система, позволяющая дифференцировать клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* молекулярно-генетическими методами с высокой специфичностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ливанова Н.Н., Ливанов С.Г., Панов В.В. Особенности распределения клещей *Ixodes persulcatus* и *Ixodes pavlovskyi* на границе лесной и лесостепной зон Приобья // Паразитология. — 2011. — Т. 45, № 2. — С. 94—103.

2. Романенко В.Н., Чекалкина Н.Б. Видовой состав иксодовых клещей на территории г. Томска // Вестник Томского государственного университета. — 2004. — № 11. — С. 132—135.

3. Differentiation of Medically Important Euro-Asian Tick Species *Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus*, *Ixodes hexagonus*, and *Dermacentor reticulatus* by Polymerase Chain Reaction / L. Rumer [et al.] // Vector Borne Zoonotic Dis. — 2011. — Vol. 11, N 7. — P. 899—905.

4. Evolution of duplicate control regions in the mitochondrial genomes of metazoa: a case study with Australasian Ixodes ticks / R. Shao [et al.] // Mol. Biol. Evol. — 2005. — Vol. 22, N 3. — P. 620—629.

5. *Ixodes philipi* (Acari: Ixodidae): Phylogenetic Status Inferred From Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I Gene Sequence Comparison / H. Mitani [et al.] // J. Parasitol. — 2007. — Vol. 93, N 3. — P. 719—722.

Сведения об авторах

Ткачев Сергей Евгеньевич — м.н.с. лаборатории молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН (630090, г. Новосибирск, проспект Лаврентьева, 8. Тел. (383) 363-51-37. E-mail: tkachev@niboch.nsc.ru)

Ливанова Наталья Николаевна — к.б.н., с.н.с. лаборатории зоомониторинга ИСЭЖ СО РАН